KISEP Otology Korean J Otolaryngol 2001;44:124-8

삼출성 중이염에서 삼출액의 점도에 따른 조성의 차이

연세대학교 의과대학 이비인후과학교실,[1] 두뇌한국 21 의과학사업단[2]
최재영[1] · 윤주헌[1,2] · 이원상[1,2] · 정명현[1]

Compositional Difference of Middle Ear Effusion according to Viscosity of the Effusion

Jae Young Choi, MD[1], Joo-Heon Yoon, MD[1,2], Won Sang Lee, MD[1,2] and Myung-Hyun Chung, MD[1]
[1]Department of Otorhinolaryngology and [2]BK21 Center for Medical Science, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Serous otitis media (SOM) is usually responsive to medical treatment, whereas mucoid otitis media (MOM) is not. This study was undertaken to elucidate the compositional difference between serous and mucoid effusion, and to investigate whether *MUC5AC* acts as a major mucin in the middle ear mucosa with MOM. **Materials and Methods** : Middle ear effusion (MEE) samples were collected from 29 patients with MOM and 20 patients with SOM. The level of mucin, lysozyme, secretory IgA and interleukin-8 were measured by dot blotting or enzyme-linked immunosorbent assay. Periodic acid-Schiff and immunohistochemical staining with monoclonal anti-*MUC5AC* antibody were performed on the serial sections of middle ear mucosa with MOM. **Results** : Mucoid effusions contained higher levels of mucin, lysozyme, secretory IgA and interleukin-8 than serous effusion. Immunohistological study revealed that *MUC5AC* mucin was expressed in only a small portion of the goblet cells of middle ear mucosa with MOM. **Conclusion** : Our study suggests that both serous secretions and mucin might make the middle ear effusion more viscous, and that mucins other than *MUC5AC* might have a major role in the viscosity of MEE. Further study is necessary to identify the major mucins in the MEE of otitis media with effusion. **(Korean J Otolaryngol 2001;44:124-8)**

KEY WORDS : Otitis media with effusion (OME) · Mucin · Lysozyme · Interleukin-8 · *MUC5AC*.

서 론

삼출성중이염(otitis media with effusion, OME)은 소아에서 가장 흔한 질병중의 하나이다. 이때 중이강내에 고이는 삼출액의 양상은 맑고 점도가 낮은 장액성 삼출액으로부터 탁하고 점도가 높은 점액성 삼출액까지 다양하다. 이러한 삼출액의 생성은 다양한 원인으로 인하여 이관의 기능에 장애가 생기면 중이강내에 음압이 발생하고, 이에 따라 혈장여과액(transudate)이 중이강내에 고인다는 hydrops ex vacuo theory로 설명되어 왔다. 또한 장액성 삼출액은 시간이 경과함에 따라 삼출액 내의 수분이 흡수되고, 단백질이 응고됨으로써 점도가 높은 점액성 삼출액으로 변한다고 하였다.[1)]

그러나 삼출액의 성분으로는 점막의 점액선이나 배세포에서 분비되는 점액성 분비물인 당단백질이 고농도로 존재하며,[2)] 리소자임[3)4)]과 secretory IgA(sIgA)[4)]등 장액선에서 분비되는 성분도 혈장에 비해 그 농도가 증가되어 있음이 밝혀져 있다. 따라서 삼출액은 삼투압의 차에 의해 수동적으로 분비되는 transudate뿐만 아니라 중이점막에서 능동적으로 분비되는 성분도 포함하고 있음을 알 수 있다. 삼출성중이염 환자의 중이점막에서 분비세포들이 과증식되어 있다는 보고[5)]도 이러한 사실을 뒷받침하고 있다. 이와 더불어 삼출액 내에 각종 사이토카인이 존재하며[6)] 최근에는 실험적으로 삼출성중이염을 유발시킨 동물의 중이점막에서 ICAM-1등의 접착분자들이 발견되는 등[7)] 삼출성중이염의 만성화에 감염 등의 염증반응이 밀접히 관련된다는 증거가 늘고 있다.

한편 삼출액의 점도가 증가되면 점액섬모수송체계(mucociliary transport system)에 장애가 일어나 삼출액이 이

논문접수일 : 2000년 10월 2일 / 심사완료일 : 2000년 12월 1일
교신저자 : 정명현, 135-720 서울 강남구 도곡동 146-92번지
연세대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (02) 3497-3462 · 전송 : (02) 3463-4570
E-mail : mhchung@yumc.yonsei.ac.kr

관으로 원활히 배출되지 못하게 된다. 이 경우 중이염은 만성화되고 약물치료에는 잘 반응하지 않으며, 수술로써 삼출액을 제거하고 환기관을 삽입하는 것이 현재로서는 유일한 치료이다. 그러나 삼출성중이염의 만성화 기전에 대한 연구를 통해 향후 보다 효과적인 새로운 치료법이 개발되어야 할 것으로 생각한다.

따라서 삼출액의 점도에 따른 정확한 성분의 차이와 어떤 종류의 점액이 삼출액의 점도 증가와 관련이 있는가에 대한 연구가 필요하나 지금까지 삼출액의 점도에 따른 체계적인 분석은 미흡한 실정이다.

이에 저자들은 점액성 삼출성중이염(mucoid otitis media, MOM) 환자와 장액성 삼출성중이염(serous otitis media, SOM) 환자의 삼출액의 구성성분의 차이를 알기 위해 점액성 분비물인 점액과 장액성 분비물인 리소자임과 sIgA 그리고 대표적 염증매개물질인 interleukin-8(IL-8)의 양을 측정, 비교하였다. 또한 삼출성 중이염에서 기도 점막의 배세포에서 발현되는 가장 대표적인 점액인 *MUC5AC*의 삼출액 점도 증가에 있어서의 역할을 알고자 이에 대한 면역조직화학적염색을 시행함으로써 점액성 중이염 환자의 중이 점막에서 배세포의 과증식이 있을 때 *MUC5AC* 점액의 발현 정도를 조사하였다.

재료 및 방법

1998년 5월부터 1999년 4월까지 연세의료원 이비인후과를 방문하여 삼출성중이염을 진단 받고 환기관 삽입술을 시행 받은 49명의 환아를 대상으로 하였다. 환아들에게는 모두 2주에서 3개월간 항생제를 투여하였으며, 스테로이드는 투여되지 않았다. 삼출액의 육안적 성상에 따라 환아들을 점액성중이염(n=29)과 장액성중이염(n=20)으로 나누었으며, 이들의 평균나이는 6세(2 11세)이었다. 본 실험에 대해서는 연세의료원 윤리위원회의 승인을 받았으며, 점막을 채취하였던 3명의 환아 부모에게 실험의 내용을 알렸다.

삼출액의 모집

환기관 삽입술시 모집기(Xomed, Jacksonville, FL, USA)를 이용하여 삼출액을 모은 후 냉동보관 하였다. 성분의 정량을 위하여 삼출액을 해동시킨 후 장액성인 경우 동량의 LSB (Laemmli sample buffer, pH 7.6, 4% SDS)를 넣어 희석하였으며, 점액성인 경우에는 채집된 용액의 2 4배의 LSB 용액으로 용해 및 희석하였다. 이를 1500 rpm에서 5분간 원심 분리하여 세포성분을 제거한 후 각 성분을 정량하였다. 삼출액 모집시 육안적으로 혈액이 섞인 경우는 실험에서 제외하였다.

점액, 비점액성 분비물 및 IL-8의 면역적 검출 및 정량

채취한 삼출액에서 각종 분비물을 다음과 같이 정량하였다. 점액과 리소자임 그리고 sIgA의 양은 dot blotting으로 측정하였고, IL-8은 enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)(R & D System, Minneapolis, MN, USA)로 측정하였다. 순수 인체 점액(a generous gift from Dr. Davis, University of North Carolina, NC, USA)과 순수리소자임(Sigma, St. Louis, MO, USA) 그리고 순수 sIgA(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 표준으로 사용하였다. 점액에 대한 일차항체로는 단클론 항체인 H6C5(1 : 1000, a generous gift from Dr. Davis, University of North Carolina, NC, USA)를, 리소자임에 대한 항체로는 다크론 항체인 rabbit anti-serum항체(1 : 1000, Dako, Capenteria, USA)를 사용하였고, sIgA에 대한 항체는 goat anti-serum 항체(1 : 1000, Cappel, Durham, NC, USA)를 사용하였다.

채취된 삼출액과 표준들은 일정한 비율로 희석하여 나이트로셀룰로즈막 혹은 ELISA판에 적용하여 일차항체와 반응시킨 후 horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG 혹은 anti-rabbit IgG에 반응시켰으며, chemiluminescence(ECL kit, Amersham, Buckingamshire, UK)로 발색시켰다. Standard curve를 linear regression analysis를 이용하여 그린 후 각 검사물의 발색정도와 비교하여 그 양을 정량하였다. 리소자임과 sIgA에 대한 항체의 특이성은 western blot으로 확인하였다. 각 환자의 삼출물의 실험결과를 평균±표준편차로서 나타냈으며, 통계학적 처리는 student's t-test로 하였다.

중이점막의 연속절편에서 periodic acid Schiff(PAS) 염색과 *MUC5AC*에 대한 면역조직화학적 염색

만성 점액성 삼출성중이염으로 오랜 기간 환기관 삽입이 필요하여 Papallera type Ⅱ형의 환기관을 삽입하기로 한 3명의 환아에서 고막을 절개한 후, 중이 갑각(promontory)의 전하방 부위의 중이 점막을 채취하였다. 이 조직에서 점액분비세포 즉 배세포의 존재를 확인하기 위하여 PAS 염색을 시행하였고, 연속절편에서 *MUC5AC*에 대한 면역조직화학적 염색을 시행하였다.

5 μm 두께로 자른 조직의 탈파라핀화와 함수과정을 거친 후 비특이성 반응을 억제하기 위해 antiserum을 처치하였으며, MUC5AC 단일항체(anti-mouse, 1 : 100, NeoMarkers Inc., Fermont, CA, USA)를 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 슬라이드를 세척한 후 2차 항체(biotinylated

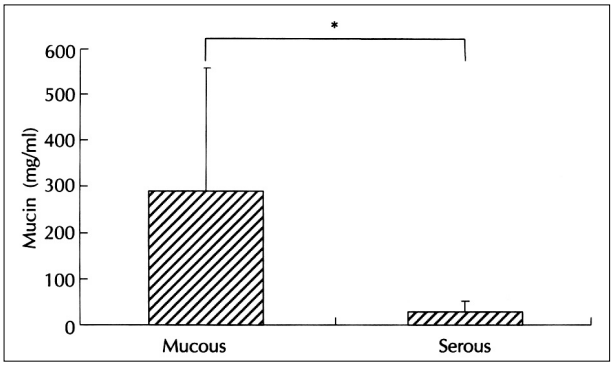

Fig. 1. The level of mucin in middle ear effusion detected by dot-blotting : mucoid vs. serous. We used mucin as an indicator of mucous secretion and the level of mucin in mucoid effusion was 12-fold higher than that in serous effusion. * : p-value <.01.

gout anti-mouse antibody)와 30분간 상온에서 반응시킨 후 Diaminobenzidine(Dako, Copenhagen, Denmark)을 발색제로 사용하여 암실에서 발색시켰으며, hematoxylin으로 대조 염색하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

결 과

점액성 분비물의 표식인 점액의 양

Dot blotting으로 측정한 점액성 삼출액에서의 점액의 양은 평균 287.9±272.4 mucin standard equivalents(mg)/ml로 장액성삼출액의 24.25±16.0 mucin standard equivalents(mg)/ml보다 의미 있게 높았다($p<0.01$)(Fig. 1).

장액성 분비물의 표식인 리소자임과 sIgA의 양

리소자임의 경우 점액성 삼출액에서 35.0±39.2 mg/ml가 검출되어 장액성 삼출액의 5.3±2.50 mg/ml에 비하여 의미 있게 높았다($p<0.01$)(Fig. 2A). sIgA의 경우에도 점액성 삼출액에서 48.4±41.0 mg/ml로 장액성 삼출액의 8.9±6.3 mg/ml보다 의미 있게 높았다($p<0.01$)(Fig. 2B).

중성구에 대한 화학주성(chemotatic activity)을 갖는 IL-8의 양

ELISA법으로 측정한 결과 점액성 삼출액에서는 519.1 ± 260.5 ng/ml의 IL-8이 측정되어, 장액성 삼출액의 38.6 ± 37.6 ng/ml 보다 유의하게 높은 양이 검출되었다($p<0.01$)(Fig. 3).

중이점막에서 *MUC5AC*점액에 대한 면역조직학적 염색

점액성 중이염 환자의 중이점막에서 PAS 염색한 결과 배세포의 과증식을 확인할 수 있었으며(Fig. 4A) 연속절편에서 *MUC5AC*점액에 대한 항체로 면역조직학적 염색을 한 결과 중이점막 배세포의 일부에서만 양성반응을 나타냈다(Fig. 4B).

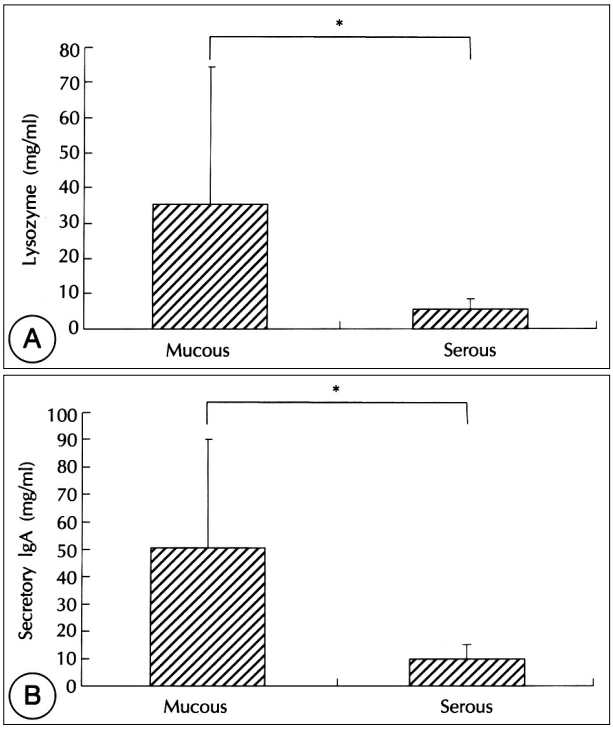

Fig. 2. The level of lysozyme (A) and secretory IgA (B) in middle ear effusion detected by dot-blotting : mucoid vs. serous. We used these levels as indicators of serous secretions. The levels of lysozyme and secreted IgA in mucoid effusion were 7- and 5-fold higher than that in serous effusion, respectively. * : p-value <.01.

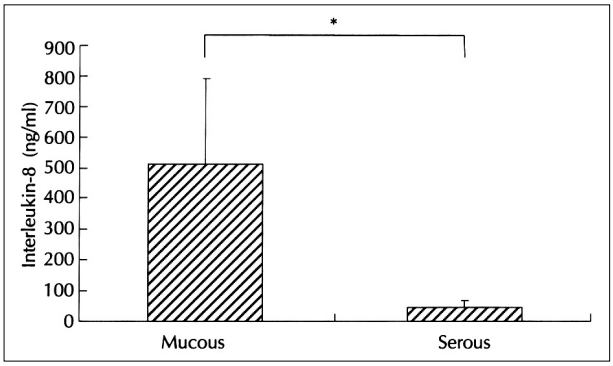

Fig. 3. The level of interleukin-8 in middle ear effusions detected by enzymelinked immunosorbent assay : mucoid vs. serous. The level of IL-8 in mucoid effusions was 13-fold higher than that in serous effusion. * : p-value <.01.

고 찰

인체의 기도 점막은 점액성 분비물 및 장액성 분비물을 모두 생성하며[8] 이러한 분비물이 지나치게 만들어지면 임

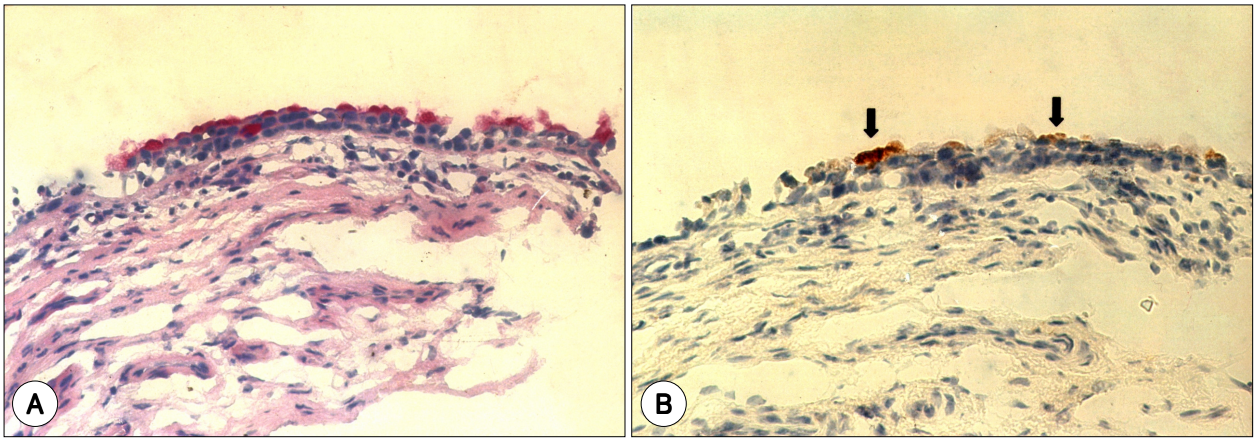

Fig. 4. Periodic acid-Schiff (PAS) staining (A) and *MUC5AC* immunostaining of middle ear mucosa with mucoid otitis media (B) (original magnification ×200). *MUC5AC* mucin (arrows) was expressed in only a small portion of the goblet cells (B) confirmed by PAS staining (A).

상적인 증상이 발생하게 된다. 상기도 점막의 하나인 중이 점막에서도 점액과 더불어 장액성 분비물들이 생성되며, 이들이 과분비되는 것이 삼출성중이염의 한 원인으로 여겨지고 있다.[2-4)]

점액은 기도 점막의 배세포와 점막하 점액선 세포에서 만들어지는데 삼출성중이염 환자의 삼출액에 다량의 당단백질이 있다고 하였으며[2)] Carrie등[9)]은 삼출액에서 점액을 PAS로 염색 후 염색정도를 colorometry로 측정하는 간접적 방법으로 정량한 결과 삼출액의 점도는 점액의 양에 비례하여 증가한다고 하였다. 저자들은 점액성 삼출액과 장액성 삼출액에서 점액의 양이 얼마나 차이 나는지 알기 위해 점액에 대한 단클론항체를 이용한 직접적인 방법으로 점액을 정량하였다. 점액성 삼출액에서는 장액성 삼출액에 비하여 평균 약 12배의 점액이 정량되어, 배세포나 점액선에서의 점액 과분비가 삼출액 점도 증가의 원인이 됨을 알 수 있었다. 그러나 어떤 종류의 점액이 증가되어 있는가에 대해서는 향후 연구에서 해결해야 할 문제이다.

저자들은 또한 두 삼출액 사이에 장액성 분비물 양의 차이를 알아보기 위해 리소자임과 sIgA의 양을 측정해 보았다. 리소자임은 점막의 장액분비세포나 삼출액 내의 염증세포에서 분비되는 단백질로 세균의 세포막 성분 중 당질을 분해하는 항균작용을 가지고 있다. 삼출성중이염 환자에서 삼출액 내의 리소자임이 혈장에 비해 증가해 있으며, 특히 삼출액의 점도가 높을 때 그 농도가 증가되어 있다고 알려져 있는데[3)] 저자들의 연구에서도 장액성 삼출액에 비해 점액성 삼출액에서 약 7배 더 많은 리소자임이 측정되었다. 이와 더불어 저자들의 측정에서는 또 다른 장액성 분비물인 sIgA도 점액성 삼출액에서 월등히 증가하였다. 이러한 사실은 MOM에서는 SOM에 비하여 점액성 분비물뿐만 아니라 장액성 분비물도 활발히 분비된다는 것을 의미한다.

염증 반응에 관여하는 대표적인 사이토카인인 IL-8은 호중구에 대한 주화인자로써 작용을 한다. IL-8이 삼출성중이염 환아의 92%에서 발견되었으며[10)] 소아환자나 삼출액의 점도가 높을 때 그 농도가 높다고 하였다.[11)] 저자들의 연구에서는 점액성 삼출액에서 장액성에 비하여 13배 이상의 높은 양의 IL-8이 검출되었는데, 이는 MOM에서는 SOM에 비해 감염 등의 염증과정이 관여한다는 사실을 암시한다.

현재까지 알려진 점액의 종류는 *MUC1-MUC4, MUC-5AC*와 *MUC5B, MUC6-MUC9, MUC11, UC12* 등 12가지이다.[12)13)] 이중 인체의 기도 점막에서는 *MUC5AC*와 *MUC-5B*가 주요 점액으로 알려져 있다.[14)]

이점막에서 발현되는 점액유전자에 대한 지금까지의 연구에서 Lin등[15)]은 백서중이점막에서 *MUC2* 유전자가 발현된다고 하였으며, Moon등[16)]은 사람의 배양된 passage-2 중이점막상피세포에서 *MUC1, MUC2, MUC5AC*와 *MUC5B*의 mRNA가 발현되었다고 하였다. 또한 Hutton등[17)]은 중이 삼출액이 *MUC5B*와 *MUC5AC*의 항체와 반응한다고 하였다. 그러나 삼출성중이염에서, 지금까지 밝혀진 12개의 점액유전자중 어떤 것이 중요한 역할을 하는지에 관한 보고는 아직 없다.

저자들은 다양한 점액유전자중 배세포에 발현되는 대표적인 점액인 *MUC5AC*의 발현에 대해 조사하였다. Buisine등[18)]은 *MUC5AC*가 사람의 기관과 기관지의 모든 배세포에서 발현되는 중요한 점액이라고 보고하였으나, Kim등[19)]은 사람 코점막에서 염증이 심한 점막의 배세포에는 *MUC5AC*가 대부분의 배세포에서 발현이 되나, 염증이 없는 후사골동의 점막에서는 거의 발현이 되지 않음으로써 *MUC5AC*가 모든 배세포에서 발현되는 것은 아니며 염증반응이 배세

포에 *MUC5AC*의 발현을 증가시킨다고 하였다. 본 연구에서도 중이점막 배세포의 일부에서만 *MUC5AC*가 발현됨으로써 이 점액이 모든 배세포에서 발현되는 것은 아님을 알 수 있었다.

결론적으로 점액성 삼출액에서는 장액성 삼출액에 비해 점액성 분비물과 장액성 분비물이 모두 증가한 결과를 보여 중이점막에서 능동적으로 분비하는 점액과 장액성 분비물에 의해 삼출액의 점도가 증가함을 보여주었다. 또한 중이점막 배세포의 일부에서 *MUC5AC*가 발현되지만, 대부분의 배세포에서 *MUC5AC*가 발현되지 않음으로써, *MUC5AC* 이외의 다른 점액이 삼출성 중이염의 발병에 주요 역할을 할 것으로 생각한다. 따라서 향후 사람의 중이점막에서 *MUC5AC*-음성 배세포에서 발현되는 점액유전자에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

중심 단어 : 삼출성 중이염 · 점액 · 리소자임 · Interleukin-8 · *MUC5AC*.

REFERENCES

1) Tonder O, Gundersen T. *Nature of the fluid in serous otitis media. Arch Otolaryngol 1971;93:473-8.*
2) Senturia BH, Carr CD, Bauman ES. *Middle ear effusion: Causes and treatment. Trans Amer Acad Opthal 1960;64:60-7.*
3) Harada T, Juhn SK, Adams GL. *Lysozyme levels in middle ear effusion and serum in otitis media. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1990;116:54-6.*
4) Veltri RW, Sprinkle PM. *Serous otitis media: Immunoglobulin and lysozyme levels in middle ear fluids and serum. Ann Otol Rhinol Laryngol 1973;82:297-301.*
5) Sade J. *Pathology and pathogenesis of serous otitis media. Arch Otolaryngol 1966;84:297-308.*
6) Yellon R, Leonard G, Marucha P. *Characterization of cytokines present in middle ear effusion. Laryngoscope 1991;101:165-9.*
7) Schousboe LP, Ovesen T, Pedersen B. *Middle ear epithelium has inflammatory capacity. Acta Otolaryngol 2000;sup 543:89-91.*
8) Basbaum CB, Jany B, Finkbeiner WE. *The serous cell. Annu Rev Physiol 1990;52:97-113.*
9) Carrie S, Hutton DA, Birchall JP, Green GGR, Pearson JP. *Otitis media with effusion: Component which contribute to the viscous properties. Acta Otolaryngol 1992;112:504-11.*
10) Maxwell KS, Fitzgerald JE, Burleson JA, Leonard G, Carpenter R, Kreutzer DL. *Interleukin-8 expression in otitis media. Laryngoscope 1994;104:989-95.*
11) Hotomi M, Samukawa T, Yamanaka N. *Interleukin-8 in otitis media with effusion. Acta Otolaryngol 1994;114:406-9.*
12) Yoon JH, Park IY. *Mucin gene expression and mucin secretion in human airway epithelium. Rhinology 1998;36:146-52.*
13) Williams SJ, McGuckin MA, Gotley DC, Eyre HJ, Sutherland GR, Antalis TM. *Two novel mucin genes down-regulated in colorectal cancer identified by differential display. Cancer Res 1999;59:4083-9.*
14) Thornton DJ, Howard M, Khan N, Sheehan JK. *Identification of two glycoforms of the MUC5B mucin in human respiratory mucus. J Bio Chem 1997;272:9561-6.*
15) Lin J, Ho S, Shekels L, Paparella MM, Kim Y. *Mucin gene expression in the rat middle ear: An improved method for RNA harvest. Ann Otol Rhinol Laryngol 1999;108:762-8.*
16) Moon SK, Lim DJ, Lee HK, Kim HN, Yoon JH. *Mucin gene expression in cultured human middle ear epithelial cells. Acta Otolaryngol (Stockh). In press.*
17) Hutton DA, Fogg FJ, Kubba H, Birchall JP, Pearson JP. *Heterogeneity in the protein cores of mucins isolated from human middle ear effusions: Evidence for expression of different mucin gene products. Glycoconj J 1998;15:283-91.*
18) Buisine M-P, Devisme L, Copin M-C, Durand-Reville M, Gosselin B, Aubert J-P, *et al. Developemtnal mucin gene expression in the human respiratory tract. Am J Respir Cell Mol Biol 1999;20:209-18.*
19) Kim CH, Song KS, Kim Hu, Yoon JH. *Expression of MUC5AC m RNA in the goblet cells of human nasal mucosa. Laryngoscope. In press.*